

## VITRIFICAÇÃO DE MÓRULAS COMPACTAS *Mus musculus*: EFEITO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO E DO PRÉ-RESFRIAMENTO DA SOLUÇÃO DE VITRIFICAÇÃO.

### VITRIFICATION OF *Mus musculus* MORULAE: EFFECT OF EQUILIBRATION TIME AND PRECOOLING OF VITRIFICATION SOLUTION.

Eugenia Mariano da Rocha Barichello\*\*  
Francisco Afonso Thiesen\*\*\*

Dalila Rosa da Silveira\*\*\*  
Fernando Thomas Medina\*\*\*

Mara Iolanda Batistella Rubin\*\*\*\*

#### RESUMO

Setecentas e quinze mórulas compactas de *Mus musculus* da cepa Suíço Albina foram vitrificadas, em dois experimentos, para avaliar, *In vitro* e *In vivo*, o efeito do tempo de equilíbrio e do pré-resfriamento da solução de vitrificação na sobrevivência após descongelamento. No experimento I (n=417) as mórulas foram vitrificadas em 4 tratamentos utilizando-se dois tempos de equilíbrio (5 e 10 minutos) na solução de vitrificação intracelular composta por 10% de glicerol + 20% de 1,2 propanediol (SVa) e duas temperaturas (4 e 20°C) na solução de vitrificação extracelular composta por 25% de glicerol + 25% de 1,2 propanediol (SVb). A análise estatística não demonstrou diferenças significativas entre os 4 tratamentos, após o descongelamento e cultivo *in vitro* aos 15 minutos (TI=97%; TII=92%; TIII=92,8%; TIV=94%), 24 horas (TI=90,2%; TII=84%; TIII=83,5%; TIV=89,2%) e 48 horas (TI=79,4%; TII=75%; TIII=73,2% e TIV=77,4%). No experimento II, 298 mórulas foram vitrificadas em 2 tratamentos. No TI foram utilizados 5 minutos de equilíbrio na SVa e SVb a 20°C e no TII 10 minutos na SVa e SVb a 4°C. Considerando apenas as receptoras prenhes, o índice de implantações foi de 54,2% (TI), 52,7% (TII) e 56,1% (frescos), não diferindo entre os tratamentos. Porém o índice de fetos obtido com o TII (45,9%) foi significativamente maior do que o índice obtido com TI(30,5%). A duração do tempo de equilíbrio e o pré-resfriamento da solução de vitrificação influenciaram o desenvolvimento *In vivo* das mórulas vitrificadas.

**Palavras-chave:** camundongos, vitrificação, mórulas.

#### SUMMARY

To test *in vitro* and *In vivo* the effects of the

length of equilibration time and precooling of the vitrification solution, 715 mouse morulae, from strain CF1 Swiss Albino, were cryopreserved by vitrification in 2 Experiments. In Experiment I (n=417) morulae were vitrified in 4 treatments, using 2 equilibration times (5 and 10 min) in the intracellular vitrification solution (VSa) composed of 10% glycerol + 20% 1,2 propanediol and 2 temperatures (4 and 20°C) in the extracellular vitrification solution (VSb) composed of 25% glycerol + 25% 1,2 propanediol. The statistical analysis did not show significative differences among the 4 treatments after thawing and culture *in vitro* within 15 minutes (TI=97%; TII=92%; TIII=92,8%; TIV=94%), 24 hours (TI=90,2%; TII=84%; TIII=83,5%; TIV=89,2%) and 48 hours (TI=79,4%; TII=75%; TIII=73,2%; TIV=77,4%). In Experiment II, 298 *Mus musculus* morulae were vitrified in 2 treatments. In TI embryos were equilibrated for 5 min in VSa and placed in straws containing the VSb at 20°C. In TII embryos were equilibrated for 10 min in VSa and placed in straws containing the VSb at 4°C. Considering only the pregnant recipients, the implantation rate was 54,2%(TI), 52,7%(TII) and 56,1% (controls), not differing among treatments, although the fetal development rate obtained with TII (45,9%) was significantly higher than TI (30,5%). Data indicate that the length of equilibration time and precooling of vitrification solution affected the postthaw *In vivo* survival of vitrified *Mus musculus* morulae.

#### INTRODUÇÃO

O método de congelamento através da vitrificação procura simplificar os procedimentos de criopreservação de embriões tirando proveito da habilidade de soluções altamente concentradas em evitar a cristaliza-

\* Trabalho financiado pelo Projeto Dr. Bozano - Banco Bozano Simonsen S.A. e apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)- 97119-900 - Santa Maria, RS.

\*\* Médico Veterinário - Aluno do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM.

\*\*\* Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, Bolsista Iniciação Científica CNPq.

\*\*\*\* Médico Veterinário, Doutor, Professor Adjunto Departamento Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR) UFSM.

ção (RALL, 1986). Após um período de equilíbrio em uma mistura de crioprotetores, quando o citoplasma se desidrata, a suspensão contendo os embriões é vitrificada por imersão em nitrogênio líquido (WOOD et al, 1987).

Os maiores obstáculos encontrados no método de vitrificação como a alta concentração de crioprotetores, a toxicidade e a injúria osmótica, além da desvitrificação têm sido abordados por diversos autores (BOU-TRON & KAUFMANN, 1978/79; FAHY et al, 1984/86/87; MACFARLANE, 1986/87; MACFARLANE & FORSYTH, 1990a/90b; MEHL, 1990).

A sobrevivência dos embriões vitrificados é afetada, principalmente, pela duração do tempo de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular (SCHEFFEN et al, 1986; VALDEZ et al, 1990), a temperatura da solução extracelular (RALL & FAHY, 1985a/85b; RALL et al, 1987) e o estágio de desenvolvimento do embrião (MASSIP et al, 1986; VAN DER ZWALMEN et al, 1989). De acordo com RALL & FAHY (1985a/85b), a exposição dos embriões às soluções de vitrificação provoca lesões tempo-dependentes nos embriões e um método de reduzir estes danos seria baixar a temperatura de exposição dos embriões para 4°C ou menos.

O primeiro experimento avaliou a viabilidade após descongelamento e cultivo *in vitro* e o segundo a sobrevivência dos embriões vitrificados após a transferência para fêmeas pseudoprenhes. Os objetivos específicos visaram avaliar: o efeito do tempo de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular e o efeito da temperatura de exposição à solução crioprotetora extracelular, na sobrevivência *in vitro* e *in vivo* das mórulas vitrificadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As fêmeas utilizadas no presente experimento eram da cepa CF1 Suíço Albina<sup>a</sup>, com idade de 7 a 10 semanas e foram superovuladas através da administração intraperitoneal de 8UI de eCG<sup>b</sup> e 8UI de HCG<sup>c</sup>, com um intervalo de 48 horas. As fêmeas doadoras foram acasaladas com machos inteiros imediatamente após a aplicação do HCG. As receptoras, produtos do cruzamento de machos CF1 x fêmeas CB10A, receberam 2UI de eCG e 2UI de HCG, com 48 horas de intervalo (KRAEMER & BOWEN, 1986). Após a aplicação de HCG as receptoras foram acasaladas com machos vasectomizados e, na manhã seguinte, as que apresentavam tampão vaginal, consideradas no "dia 1" de pseudo-prenhez. Utilizou-se uma assincronia de -12 a -24 horas em relação às doadoras.

O meio PBS modificado (WHITTINGHAM, 1971) foi utilizado para a coleta, cultivo e preparo das soluções de congelamento e diluição do crioprotetor.

A coleta dos embriões foi realizada 78-80 horas após a aplicação do HCG, sendo utilizados no presente experimento embriões classificados como excelentes ou bons.

A solução crioprotetora intracelular ou de equilíbrio era composta por uma associação de 10% de glicerol<sup>d</sup> + 20% de 1,2 propanediol<sup>e</sup> em PBS acrescido de 20% de SFB<sup>f</sup>.

A solução crioprotetora extracelular ou de vitrificação era composta por 25% de glicerol + 25% de 1,2 propanediol em PBS + 20% de SFB.

### Equilíbrio e vitrificação

No Experimento I as mórulas foram submetidas a 4 tratamentos:

- TI - 5 minutos de equilíbrio a 20°C e solução de vitrificação extracelular a 20°C por 30 segundos;
- TII- 10 minutos de equilíbrio a 20°C e solução de vitrificação extracelular a 20°C por 30 segundos;
- TIII- 5 minutos de equilíbrio a 20°C e solução de vitrificação extracelular a 4°C por 30 segundos;
- TIV- 10 minutos de equilíbrio a 20°C e solução de vitrificação extracelular a 4°C por 30 segundos.

No experimento II as mórulas foram submetidas a 2 tratamentos:

- TI - 5 minutos de equilíbrio a 20°C e solução de vitrificação extracelular a 20°C por 30 segundos;
- TII- 10 minutos de equilíbrio a 20°C e solução de vitrificação extracelular a 4°C por 30 segundos.

Com auxílio de uma seringa acoplada a palheta de 0,25ml foram aspirados, primeiramente 0,07ml de solução extracelular, seguidos de uma bolha de ar (0,02ml), nova coluna de solução de vitrificação (0,05ml). Os embriões foram colocados na segunda coluna de solução de vitrificação e as palhetas completadas com solução 1.0M de sacarose, após a aspiração de outra bolha de ar. As palhetas foram seladas com ponteiros identificadas previamente e colocadas no vapor de nitrogênio por 30 segundos, sobre uma grade horizontal e imediatamente após mergulhadas no nitrogênio líquido.

### Descongelamento e diluição do crioprotetor

O descongelamento foi efetuado em banho-maria a 20°C, durante 10 segundos e a diluição do crioprotetor feita em duas etapas com sacarose 1.0M. Os embriões foram colocados em uma gota de 1ml de sacarose 1.0M a 4°C por 4 minutos, e os 6 minutos restantes permaneceram em uma gota de 0,2ml de sacarose 1.0M a 20°C.

### Experimento I - Avaliação in vitro

Após o descongelamento e diluição do crioprotetor, quando completaram o tempo de 15 minutos em PBS+20% SFB, os embriões foram submetidos a uma primeira avaliação, quando os embriões considerados viáveis foram cultivados em estufa a 37°C em atmosfera úmida, utilizando-se o meio PBS modificado acrescido de 20% de SFB. Após 24 horas de cultivo foi realizada uma segunda avaliação, quando foram considerados viáveis os que atingiram, no mínimo, o estágio de blastocisto inicial (Bi) e após 48 horas foram considerados viáveis os que atingiram no mínimo o estágio de blastocisto expandido (Bx). O percentual de sobrevivência foi calculado considerando o número de embriões recuperados após o descongelamento.

### Experimento II - Avaliação in vivo

Após o descongelamento, diluição e cultivo por 1 hora em estufa, as mórulas consideradas como grau I e II (WHITTINGHAM, 1981), foram transferidas para receptoras pseudoprenhes, num total de 5 a 6 embriões por corno uterino. Entre os dias 14 e 16 de gestação as receptoras foram sacrificadas, sendo verificado o número de implantações, o qual incluiu as reabsorções embrionárias e fetos com desenvolvimento normal.

### Análise Estatística

Os dados do Experimento I foram submetidos a análise de variância e teste F. Os resultados do Experimento II foram submetidos ao teste  $X^2$ .

## RESULTADOS

### Experimento I - Avaliação in vitro

A permanência dos embriões durante 5 ou 10 minutos na solução crioprotetora intracelular e o pré-resfriamento da solução de vitrificação a 4°C não exerceram influência sobre o percentual de sobrevivência, após cultivo, das mórulas compactas vitrificadas em nenhum dos tempos de avaliação considerados, ou seja, 15 minutos, 24 horas e 48 horas.

Os percentuais médios de viabilidade, obtidos após a diluição do crioprotetor e cultivo in vitro, são apresentados na Tabela 1.

Os quatro tratamentos utilizados não diferiram

TABELA 1 - Percentual de viabilidade após a diluição do crioprotetor e cultivo in vitro de mórulas *Mus musculus* submetidas a vitrificação utilizando dois tempos de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular (SVa) e duas temperaturas na solução crioprotetora extracelular (SVb).

TRATAMENTOS		Embriões Tratados		Viabilidade após cultivo		
SVa (min.)	SVb (°C)	Congel. n	Recuperados n (%)	15min. n (%)*	24h n (%)*	48h n (%)*
5	20	106	102(96,2)	99(97,0)	92(90,2)	81(79,4)
10	20	103	100(97,0)	92(92,0)	84(84,0)	75(75,0)
5	4	103	97(94,2)	90(92,8)	81(83,5)	71(73,2)
10	4	105	102(97,1)	96(94,1)	91(89,2)	79(77,4)
		417	401(96,1)	377(94,0)	348(86,8)	306(76,3)

\* índice calculado sobre o número de embriões recuperados.

significativamente, quanto ao desenvolvimento in vitro, quando foi considerado o estágio de blastocisto inicial (Bi) após 24 horas de cultivo e blastocisto expandido (Bx) após 48 horas de cultivo.

### Experimento II - Avaliação in vivo

Das 298 mórulas vitrificadas, 96,6% foram recuperadas e, destas, 93% estavam viáveis após uma hora de cultivo e foram transferidos para fêmeas pseudoprenhes (Tabela 2).

Os percentuais de implantações, incluindo fetos e reabsorções, verificados entre os dias 14 e 16 de gestação, após a transferência de embriões vitrificadas e frescos, para fêmeas pseudoprenhes, estão representados na Tabela 2.

A análise estatística demonstrou que o percentual de fetos sobre o total de embriões em fêmeas gestantes obtido com o tratamento II (10 minutos de equilíbrio na solução de vitrificação intracelular e solução de vitrificação extracelular a 4°C), foi significativamente superior ( $p < 0.05$ ) ao tratamento I (5 minutos de equilíbrio e solução de vitrificação extracelular a 20°C) e não diferiu significativamente do grupo controle (Tabela 2 e Figura 1).

O percentual de reabsorções embrionárias, sobre o total de embriões em fêmeas gestantes, foi significativamente maior ( $P < 0.01$ ) no tratamento I do que no tratamento II e no grupo controle. O percentual geral

TABELA 2 - Desenvolvimento in vivo de mórulas compactas após vitrificação, descongelamento rápido e transferência para fêmeas pseudoprenhes.

TRATAMENTOS		Embriões Testados		Embriões	Viáveis	Desenvolv. aos 14-16d prenhez		
SVa	SVb	Cong.	Recuperados	Após 1h	Em fêmeas	Implant.	Fetos	Reabsorções
(min.)	(°C)	n	n (%)	n (%)	n (%)#	n (%)*	n (%)*	n (%)*
TI	5 20	147	143(97,6)	135(94,3)	72(53,5)	39(54,2)	22(30,5) <sup>b+</sup>	17(23,6) <sup>b++</sup>
TII	10 4	151	145(96,0)	133(91,7)	74(55,6)	39(52,7)	34(45,9) <sup>a</sup>	05(6,7) <sup>a</sup>
CONTROLE	---	---	---	150	82(54,7)	46(56,1)	41(50,0) <sup>a</sup>	05(6,1) <sup>a</sup>
		298	288(96,6)	418	228(54,5)	124(54,3)	97(42,1)	27(11,8)

# Embriões transferidos para fêmeas que resultaram prenhes

\* Calculado sobre o número de embriões transferidos para fêmeas que estabeleceram prenhez.

a,b Médias seguidas de letras desiguais na coluna, diferem estatisticamente pelo teste do X<sup>2</sup>(+=p<0,05; ++=p<0,01)

de implantações, incluindo fetos e reabsorções, não diferiu entre os dois tratamentos e o grupo de embriões frescos (Tabela 2 e Figura 1).

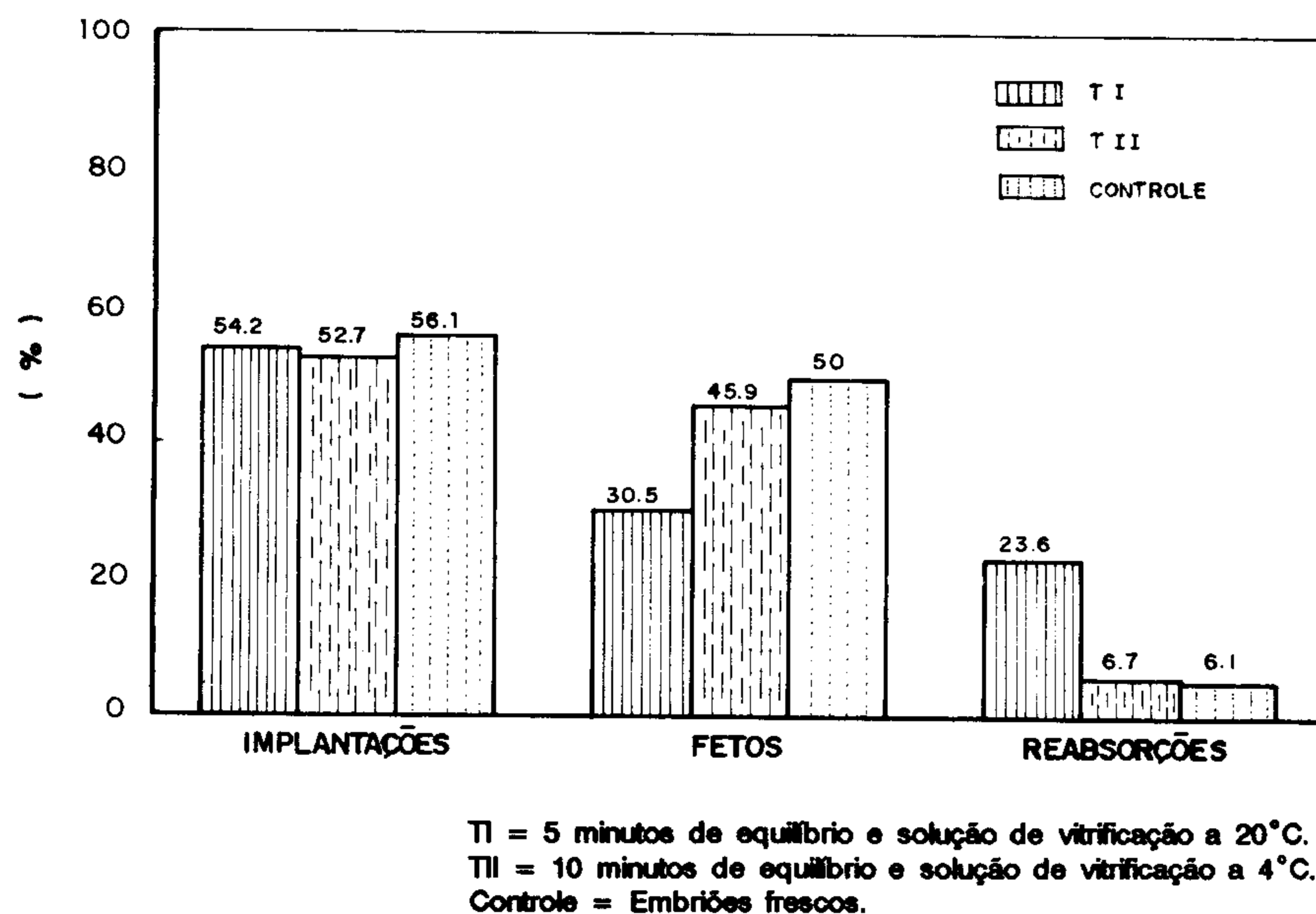


FIGURA 1 - Percentuais de implantações, fetos e reabsorções aos 14-16 dias após transferência de embriões vitrificados para fêmeas pseudoprenhes.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No método de vitrificação são utilizadas soluções crioprotetoras altamente concentradas e os riscos advindos deste fato, como a toxicidade, devem ser cuidadosamente avaliados, procurando-se a melhor maneira de contorná-los. RALL (1987) afirmou que a intensidade da toxicidade química está diretamente relacionada com a concentração da solução de vitrificação e o tempo e temperatura de exposição dos embriões a esta solução.

A utilização, no presente experimento, de uma solução de vitrificação menos tóxica, como a desenvolvida por SCHEFFEN et al (1986), proporcionou a utilização de uma metodologia mais simples, além do pré-resfriamento da solução de vitrificação extracelular e o tempo mínimo de exposição a esta solução (30 segundos) terem proporcionado uma redução adicional na toxicidade. Outro fator importante foi a utilização da diluição com sacarose (LEIBO & MAZUR, 1978), que proporciona a retirada do crioprotetor de uma maneira mais rápida e simples do que a diluição em etapas, evitando uma maior exposição dos embriões aos crioprotetores. Aliás, RALL et al (1987) sugeriram que a utilização da diluição com sacarose e a utilização de soluções menos tóxicas, tendo como base o glicerol ou o 1,2 propanediol (RALL, 1986/87) ou estes dois crioprotetores associados (SCHEFFEN et al, 1986) poderiam reduzir a toxicidade e evitar os danos osmóticos após a vitrificação.

O fato de não terem sido observadas diferenças significativas, durante o cultivo in vitro, entre os trata-

mentos do Experimento I, com as variáveis tempo de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular e temperatura de exposição à solução crioprotetora extracelular reforça a opinião de WHITTINGHAM (1981), de que os danos reais, produzidos durante o congelamento e o descongelamento, são melhor detectados através da transferência dos embriões congelados para fêmeas pseudo-prenhes, visto que no Experimento II, os embriões equilibrados por 10 minutos e expostos a solução final de vitrificação a 4°C, resultaram em um maior índice de fetos.

Estes resultados estão de acordo com os relatos de SCHEFFEN et al (1986) e VALDEZ et al (1990), segundo os quais o tempo de equilíbrio de 10 minutos proporciona uma melhor sobrevivência para os embriões de camundongo no estágio de mórula compacta. Além disso, a temperatura de 4°C, durante a exposição à concentração final da solução de vitrificação, que proporcionou melhores resultados durante a avaliação *in vivo*, também foi indicada por RALL & FAHY (1985a/85b/85c), RALL et al (1985/87) e TAKAHASHI et al (1986) como forma de reduzir a toxicidade, durante a exposição às soluções crioprotetoras mais concentradas.

O maior percentual de reabsorções, encontrado após a transferência dos embriões submetidos ao tratamento I (5 minutos de equilíbrio e solução de vitrificação a 20°C) mostra que, danos mais profundos, não perceptíveis na avaliação *in vitro*, devem ter ocorrido com este protocolo, os quais se manifestaram apenas na avaliação *in vivo*, o que também foi observado por RALL et al (1987).

WHITTINGHAM (1981) observou que havia uma correlação positiva entre o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*. Mas, na verdade o que se observa, é que esta relação diz respeito ao percentual de implantações e não ao percentual de fetos em desenvolvimento ou nascidos (BERNARDI, 1989), já que no experimento II, o percentual geral de implantações, somando fetos e reabsorções, não diferiu entre os tratamentos (Figura 1), o que pode ser comparado aos resultados do experimento I, quando não houve diferença, durante o cultivo *in vitro*, entre os quatro tratamentos testados (Tabela 1).

A metodologia utilizada para a vitrificação proporciona redução de tempo e custos em relação aos métodos convencionais de criopreservação e desta maneira poderia ser melhor investigada visando a preservação de espécies domésticas economicamente importantes e de espécies em extinção. Porém, o aperfeiçoamento deste método dependerá do desenvolvimento de soluções de vitrificação menos tóxicas, onde o tempo e a temperatura de exposição a estas soluções não terão um papel tão decisivo na sobrevivência dos embriões. Além disso, o desenvolvimento de procedimentos que minimizem a toxicidade química e o estresse osmótico durante a exposição às soluções de vitrificação e a diluição do crioprotetor, como os que foram testados du-

rante o presente experimento, poderão aumentar a sobrevivência *in vivo* dos embriões criopreservados por esta técnica.

## FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - IPB - Instituto de Pesquisas Biológicas - Rua Domingos Crescêncio, 132 - 90620 - Porto Alegre - RS.
- b - INTERGONAN - Vemie Veterinaer Chemie - 4152 Kempen 1 - Alemanha.
- c - PRYMOGONIL - Schering D - 1000 Berlin 65 - Alemanha.
- d - MERCK - Caixa Postal 55077 - 22700 Rio de Janeiro - RJ.
- e - INTERLAB - Distribuidora de Produtos Científicos Ltda. Rua Luiz Goez, 853/859 - 04043 - São Paulo - SP.
- f - LABORCLIN - Rua Cassiano Ricardo, 455 - Pinhais - Piraraquara - PR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDI, M.L. Avaliação de diferentes concentrações de sacarose e lactose no congelamento ultra-rápido de mórulas *Mus musculus*. Santa Maria, UFSM, 1989, 105 p. Dissertação (Mestrado, em Medicina Veterinária). Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1989.
- BOUTRON, P., KAUFMANN, A. Stability of the amorphous state in the system water - glycerol - dimethyl sulfoxide, *Cryobiology*, v. 15, p. 93-108, 1978.
- BOUTRON, P. & KAUFMANN, A. Stability of the amorphous state in the system water - 1,2 propanediol. *Cryobiology*, v. 16, p. 557-568, 1979.
- FAHY, G.M., LEVY, D.I., ALI, S.E. Vitrification Solutions: molecular and biological aspects. *Cryobiology*, v. 23, p. 560, 1986. Abstract.
- FAHY, G.M., LEVY, D.I., ALI, S.E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*, v. 24, p. 196-213, 1987.
- FAHY, G.M., MACFARLANE, D.R., ANGELL, C.A., et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v. 21, p. 407-426, 1984.
- KRAEMER, D.C., BOWEN, M.J. Embryo Transfer in laboratory animals. In: MORROW, D.A. *Current herapy In heriologendogy*. Philadelphia: Saunders Company, 1986. Cap. IV, p. 73-74.
- LEIBO, S.P., MAZUR, P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: DANIEL Jr., J.C. *Methods in mammalian reproduction* New York: Academic Press, 1978. Cap. 8, p. 178-201.
- MACFARLANE, D.R. Devitrification in glass forming aqueous solutions. *Cryobiology*, v. 23, p. 230-244, 1986.
- MACFARLANE, D.R. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology*, v. 24, p. 181-195, 1987.

- MACFARLANE, D.R., FORSYTH, M. Recent insights of the role of cryoprotective agents in vitrification. *Cryobiology*, v. 27, p. 345-358, 1990a.
- MACFARLANE, D.R., FORSYTH, M. Aspects of solute-water interactions in the promotion of vitrification. *Cryobiology*, v. 27, p. 641, 1990b. Abstract.
- MASSIP, A., VAN DER ZWALMEN, P., SCHEFFEN, B. et al. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* v. 7, p. 270-273, 1986.
- MEHL, P. Experimental dissection of devitrification in aqueous solutions of 1,3 butanediol. *Cryobiology*, v. 27, p. 378-400, 1990.
- RALL, W.F. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Cryobiology*, v. 23, p. 548, 1986. Abstract.
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, v. 24, p. 387-402, 1987.
- RALL, W.F., FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. *Nature*, v. 313, p. 573-575, 1985a.
- RALL, W.F., FAHY, G.M. Vitrification: a new approach to embryo cryopreservation. *Theriogenology*, v. 23, p. 220, 1985b. Abstract.
- RALL, W.F., FAHY, G.M. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Cryobiology*, v.22, p.603, 1985c. Abstract.
- RALL, W.F., WOOD, M.J., KIRBY, C. In vivo development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, v. 22, p. 603-604, 1985.
- RALL, W.F., WOOD, M.J., KIRBY, C., et al. Development of mouse embryos criopreserved by vitrification. *J Reprod Fert*, v: 80, p. 499-504, 1987.
- SCHEFFEN, B., VAN DER ZWALMEN, P., MASIP, A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters* v. 7, p. 260-269, 1986.
- TAKAHASHI, T., HIRSH, A., ERBE, E.F., et al. Vitrification of human monocytes. *Cryobiology*, v. 23, p. 103-115, 1986.
- VALDEZ, C.A., ABAS MAZNI, O., TAKAHASHI, T., et al. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, v. 33, p. 627-636, 1990.
- VAN DER ZWALMEN, P., TOUATI, K., ECTORS, F.J., et al. Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology*, v. 31, p. 270, 1989. Abstract.
- WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v. 233, p. 125-126, 1971.
- WHITTINGHAM, D.G. Sensivity of mouse embryos to the rate of thawing. In: WORKSHOP ON FROZEN STORAGE OF LABORATORY ANIMALS, 1980. Harwell. *Proceedings ...Stuttgart, Gustav Fischer, 1981, p. 21-32.*
- WOOD, H.J., WHITTINGHAM, D.G., RALL, W.F. The low temperature preservation of mouse oocytes and embryos. In: MONK, M. *Mammalian development* Oxford: I.R.L. Press, 1987. Cap. 13, p. 255-281.